

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-098177

(43)Date of publication of application : 03.04.2003

---

(51)Int.Cl.

G01N 33/68  
C07K 14/76  
G01N 21/78  
G01N 33/483  
G01N 33/493

---

(21)Application number : 2001-291898

(71)Applicant : TOKURIKI SHIGERU

(22)Date of filing : 25.09.2001

(72)Inventor : TOKURIKI SHIGERU  
FUKUOKA SHINICHI

---

(54) METHOD FOR MEASURING DEGREE OF FATIGUE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To develop an accurate, simple, and noninvasive method for determining fatigue.

SOLUTION: It is possible to accurately and simply measure the degree of fatigue by using methylene blue instead of a thionin aqueous solution in 'Donaggio reaction' and measuring absorbance in a wavelength in the vicinity of 620 nanometers.

---

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-98177

(P2003-98177A)

(43) 公開日 平成15年4月3日 (2003.4.3)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	キーワード (参考)
G 0 1 N 33/68		C 0 1 N 33/68	2 G 0 4 j
C 0 7 K 14/76		C 0 7 K 14/76	2 G 0 5 4
G 0 1 N 21/78		G 0 1 N 21/78	Z 4 H 0 4 5
33/483		33/483	C
33/493		33/493	A
審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 6 頁)			

(21) 出願番号	特願2001-291898 (P2001-291898)	(71) 出願人	501374806 徳力 滋 京都府京都市北区小山上初音町65 株式会 社エクセルアンドパウエルコンサルファーム内
(22) 出願日	平成13年9月25日 (2001.9.25)	(72) 発明者	徳力 滋 京都府京都市北区小山上初音町65 株式会 社エクセルアンドパウエルコンサルファーム内
		(74) 代理人	100091096 弁理士 平木 祐輔 (外2名)
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 疲労度測定方法

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、正確・簡便な非侵襲的疲労判定法の開発を課題とする。

【解決手段】 「ドナジオ反応」におけるチオニン水溶液に代えて、メチレンブルーを用いること及び620ナノメートル近辺の波長で吸光度を測定することで、正確かつ簡便に疲労度を測定できることを見出した。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 尿中のアルブミンからなる疲労指標物質。

【請求項2】 尿中のアルブミンを測定することを特徴とする疲労度測定方法。

【請求項3】 尿にメチレンブルーを添加した後、モリブデン酸アンモニウムを添加し、培養した後遠心分離して上澄みの吸光度を測定することを特徴とする疲労度測定方法。

【請求項4】 吸光度を620ナノメートル近辺の波長で測定することを特徴とする請求項3記載の疲労度測定方法。

【請求項5】 短冊状の濾紙の一端(マイナス端)から順番に、尿に浸漬(もしくは尿を滴下)する部分、メチレンブルーを吸収させた部分、モリブデン酸アンモニウムを吸収させた部分、沈殿物を通さず溶液のみを通すフィルターもしくはメッシュ構造物を挿入した部分及び結果を観察する窓を設けた部分(プラス端)からなる尿中アルブミン測定キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、正確かつ簡便な疲労判定方法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来、生体内カルシウムの濃度の上昇が、動物の疲労状態と密接に関連していることが知られている(特開2000-9717号公報)。また、疲労の判定方法として「ドナジオ反応」というものがある。これはイタリアのドナジオが、モリブデン酸アンモニウムと色素チオニンを水溶液中で混和すると、両者は複合体を形成し速やかに沈殿してしまうが、そこに疲労したヒトの尿を加えると、沈殿が阻止され色素が水溶性状態を保つことを見出したことに基づく。

【0003】具体的には、まず被検尿をろ紙でろ過し、1~2分煮沸冷却後再ろ過する。その被検尿を酢酸酸性として使用するが、試薬として①0.1%(w/v)チオニン水溶液②0.01%(w/v)チオニン水溶液③4%(w/v)モリブデン酸アンモニウム水溶液を用い、この3種の試薬を順序を変えて添加し6回反応を行わせる。この6回の反応の溶液の液色、沈殿の有無で採点し、反応が陽性であったものについて、再度反応させ両方の合計点で疲労度を測定するものである。

【0004】しかし、この方法は反応操作が煩雑で定量性に乏しく、判定を肉眼的な所見に頼っていたため正確性に欠ける欠点があった。従って正確かつ簡便な疲労判定法の開発が待たれているところである。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、正確・簡便な非侵襲的疲労判定法の開発を課題とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、上記課題を解決すべく鋭意努力した結果、チオニン水溶液に代えてメチレンブルーを用いること及び620ナノメートル近辺の波長で吸光度を測定することで、正確かつ簡便に疲労度を測定できることを見出した。

【0007】すなわち、本発明は

(1)尿中のアルブミンからなる疲労指標物質。

(2)尿中のアルブミンを測定することを特徴とする疲労度測定方法。

(3)尿にメチレンブルーを添加した後、モリブデン酸アンモニウムを添加し、培養した後遠心分離して上澄みの吸光度を測定することを特徴とする疲労度測定方法。

【0008】(4)吸光度を620ナノメートル近辺の波長で測定することを特徴とする(3)記載の疲労度測定方法。

(5)短冊状の濾紙の一端(マイナス端)から順番に、尿に浸漬(もしくは尿を滴下)する部分、メチレンブルーを吸収させた部分、モリブデン酸アンモニウムを吸収させた部分、沈殿物を通さず溶液のみを通すフィルターもしくはメッシュ構造物を挿入した部分及び結果を観察する窓を設けた部分(プラス端)からなる尿中アルブミン測定キットに関する。

【0009】肉体的疲労時において、尿中になんらかの物質が排出され、その量は疲労強度におおむね比例することはわかっている(図1A、B)。本発明者等は、つぎの手法でまず尿中の疲労指標物質が何かについて検討してみた。その検討結果について以下の実験例で示す。

【0010】(実験例1)運動による負荷をかけた健康人から採取した尿を5000×Gで20分間遠心分離し、限外ろ過することによって尿中疲労指標物質の分子量の推定を行った。その結果、分子量30000以上の画分が、改良型ドナジオ反応(尿にメチレンブルーを添加した後、モリブデン酸アンモニウムを添加し、培養した後遠心分離して上澄みの吸光度を測定する方法)に強陽性を呈したことから、疲労指標物質が分子量30000以上の高分子の物質であることが示唆された(図2)。

【0011】(実験例2)疲労指標物質が蛋白質か否かを検討する目的で、尿を蛋白質分解酵素で処理することが、ドナジオ反応に与える影響について検討を行った。その結果ProteinaseK及びTrypsin処理によって、ドナジオ反応値が顕著に減少することがわかり、疲労指標物質が蛋白質であることが確認された(図3)。

【0012】(実験例3)ドナジオ反応を陽性にする蛋白質を疲労尿の分子量30000以上の画分から単離・精製した。その結果、この蛋白質はヒト血清アルブミン分子と同一の物質であると同定された。

【0013】(実験例4)尿中のアルブミンがドナジオ反応を陽性にする物質であるかどうか検討する目的で、疲労尿からアルブミン分子を蛋白質分解酵素処理及び免疫学的方法で除去し、このときドナジオ反応要請が消失す

るか、さらに、ここにアルブミン分子を再添加したとき、ドナジオ反応陽性が回復するかどうかについて検討した。

#### 【0014】1. 蛋白分解酵素処理

アルブミンを含む尿を蛋白質分解酵素ProteinaseK処理すると、ドナジオ反応陽性が消失した。その尿に、酵素処理前に含まれていた量のアルブミンを再添加することによって、ドナジオ反応はもとのレベルに回復した。

#### 【0015】2. 免疫学的除去

アルブミンを含む尿を、抗ヒトアルブミン抗体と反応させた後、アルブミン・抗体複合体をプロテインGビーズで沈降させ、尿中からアルブミンを完全に除去すると、この尿はドナジオ反応陽性を示さなくなった。ここへ、精製ヒトアルブミンを抗体処理前に含まれていた量と同じだけ再添加したところ、ドナジオ反応陽性が回復した(図4)。以上の結果から、尿中アルブミンがドナジオ反応を陽性にする物質であることが示された。

【0016】本発明者等は、この知見に基づいて「ドナジオ反応」の改良を模索した結果、チオニン水溶液に代えてメチレンブルーを用いること及び遠心分離した上澄み液の、620ナノメートル近辺の波長の吸光度を測定することで解決できることを見出した。

【0017】そして、本発明に用いるメチレンブルーの濃度とモリブデン酸アンモニウムの濃度とは、反応が成立(沈殿形成)するためには2:1の関係が必要であることもわかった。また、客観的な数値定量法とするために、以下の実験を行った。

【0018】(実験例5)同じモル濃度のチオニンとメチレンブルー水溶液を調製し、その吸光度スペクトルを測定した。その結果、両者ともに特徴的なスペクトルが得られたが、そのピーク値は、チオニンでは540ナノメートル、メチレンブルーでは620ナノメートルであった。さらにピーク値はメチレンブルーのほうが際立って高かった(図5)。

【0019】すなわち、メチレンブルーのほうが単位濃度当たりの分子吸光係数が高く、また620ナノメートルはより長波長のため、尿に存在するビリルビン等の黄色発色(400~500ナノメートル)の干渉を受けにくい。

【0020】従って、本発明は反応液上澄みに存在するメチレンブルー由来の620ナノメートル(±20ナノメートル)吸収を定量することにより、より正確な定量値を与えることができた。

【0021】従って、メチレンブルーの必要最低濃度(許容限界の下値)は、上澄み液中のメチレンブルー由来の620ナノメートル吸収を測定することにより規定されるが、正確に測定するためには、最低、0.2OD(吸光度)が必要であり、そのためには、反応溶液中に、20 $\mu$ mol/mlのメチレンブルーが含まれていることが必須である。すなわち、モリブデン酸アンモニウムの濃度は最低でも10 $\mu$ mol/mlが必要である。

【0022】反応温度・時間については、37℃、60分程度が好ましく、遠心分離は300 $\times$ gで2分間程度が好ましいことを確認した。また、上記実験の結果判明した尿中アルブミンの測定方法につき、簡便な方法も開発した。

【0023】すなわち、従来のアルブミン測定方法は、抗ヒトアルブミン抗体を用いる免疫学的測定法であるが、この方法では抗体の調製、金コロイド粒子による標識等、多段階かつ高価な準備を必要とする。

【0024】この簡便な測定方法は、糖尿病の危険信号とされる微量アルブミン尿の濃度測定にも有効に機能する。特に、糖尿病の危険信号とされる微量アルブミン尿の濃度は、尿1ml当たり数十 $\mu$ gから300 $\mu$ gであるから、陽性反応点を100 $\mu$ g前後に設定することにより、糖尿病の危険信号閾値を超える量の尿中微量アルブミンを検出することができる。

【0025】そして、高血圧疾患、虚血性心疾患、梗塞、血栓等も微量アルブミン尿と関連があることから、これらの早期発見に役立つものと言える。以下に改良型「ドナジオ反応」について、実施例で具体的に説明する。

#### 【0026】

【発明の実施の形態】〔実施例1〕ヒトアルブミンを0から2000 $\mu$ l/mgの濃度になるようにリン酸緩衝液を用いて調製し、改良型ドナジオ反応に供した。

【0027】その結果、アルブミン濃度が、200 $\mu$ l/mg以下ではドナジオ反応値は吸光度0.01以下で陰性のまま推移した。一方、アルブミン濃度が、200 $\mu$ l/mgになると急激な陽転を示し、以降、濃度依存的にドナジオ反応値は上昇した(図6)。

〔実施例2〕改良型ドナジオ反応に使用するメチレンブルー濃度を1/10にすることにより、アルブミンのドナジオ反応に対する陰性から陽性への転換閾値を、約125 $\mu$ l/mgとすることができた(図7)。

〔実施例3〕改良型ドナジオ反応における試薬の添加順序を、尿サンプルに4%モリブデン酸アンモニウム溶液を添加した後、0.1%メチレンブルー水溶液を加えるように変更すると、比較的線型性を保った濃度・反応曲線を得ることができる(図8)。

【0028】このことにより、疲労尿中のアルブミン量をドナジオ反応値から定量的に推定することを可能ならしめる。

〔実施例4〕尿中アルブミン測定キットを以下の方法により作成した。

【0029】図9からわかるように、短冊状の濾紙の一端(マイナス端)から順番に、尿に浸漬(もしくは尿を滴下)する部分、メチレンブルーを吸収させた部分、モリブデン酸アンモニウムを吸収させた部分、沈殿物を通さず溶液のみを通すフィルターもしくはメッシュ構造物を挿入した部分及び結果を観察する窓を設ける部分(プラ

ス端)をセットする。

【0030】マイナス端に添加された尿溶液は、毛管現象によって濾紙中をマイナス端からプラス端方向へ移動するが、尿に一定量以上の疲労物質が存在しない場合、メチレンブルーは尿により可溶化されたあと移動し、モリブデン酸アンモニウムと反応し沈殿を形成する。沈殿はフィルター部分を通過できず、尿溶液のみプラス端方向へ移動し、観察窓で尿溶液本来の色(無色ないし淡褐色)が観察される(陰性)。

【0031】一方、尿に一定量以上の疲労物質が存在する場合、疲労物質とメチレンブルーは結合し、モリブデン酸アンモニウムとの沈殿反応は起さない。疲労物質と結合したメチレンブルーは水溶性であるから、フィルターを通過し観察窓にメチレンブルーの青色を与える(陽性)。

【0032】メチレンブルー及びモリブデン酸アンモニウムの付加量を変更することにより、疲労物質の量を測定することができる。

【0033】また、あらかじめ青色発色の程度をパネル化した得点表をつくり、反応発色が線型に起こるような条件(実施例3)のクロマトグラフィーを行い、疲労物質の出現量を半定量化することができる(図10)。

【0034】

【発明の効果】本発明により、疲労の程度を正確・簡便に測定することができ、過労死の予防や疲労回復剤の開発に有用なデータを提供することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1A】ドナジオ反応に与える影響を示す図。

【図1B】ドナジオ反応に与える影響を示す図。

【図2】尿中疲労指標物質の分子量を示す図。

【図3】尿中疲労指標物質が蛋白質であることを示す図。

【図4】免疫除去実験を示す図。

【図5】メチレンブルーとチオニンの吸光度スペクトルの比較を示す図。

【図6】精製ヒトアルブミンがドナジオ反応に与える影響を示す図。

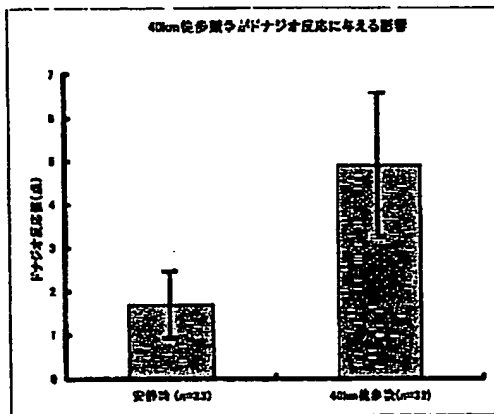
【図7】メチレンブルーの濃度を1/10にした場合の、精製ヒトアルブミンがドナジオ反応に与える影響を示す図。

【図8】試薬の添加順序を変更した場合の、精製ヒトアルブミンがドナジオ反応に与える影響を示す図。

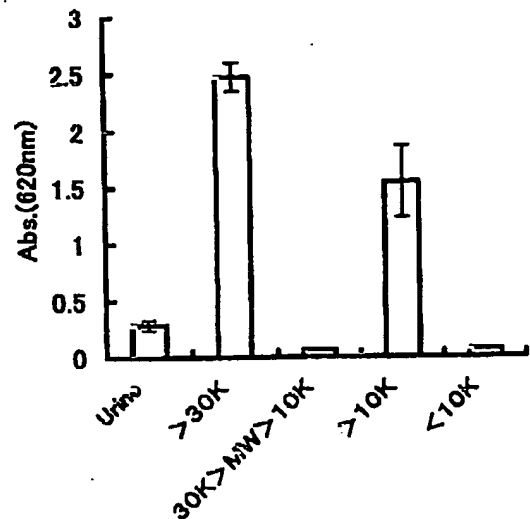
【図9】尿中アルブミン測定キットを示す図。

【図10】青色発色の程度をパネル化した得点表を示す図。

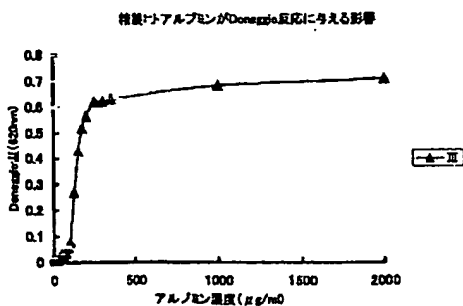
【図1A】



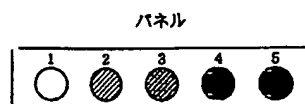
【図2】



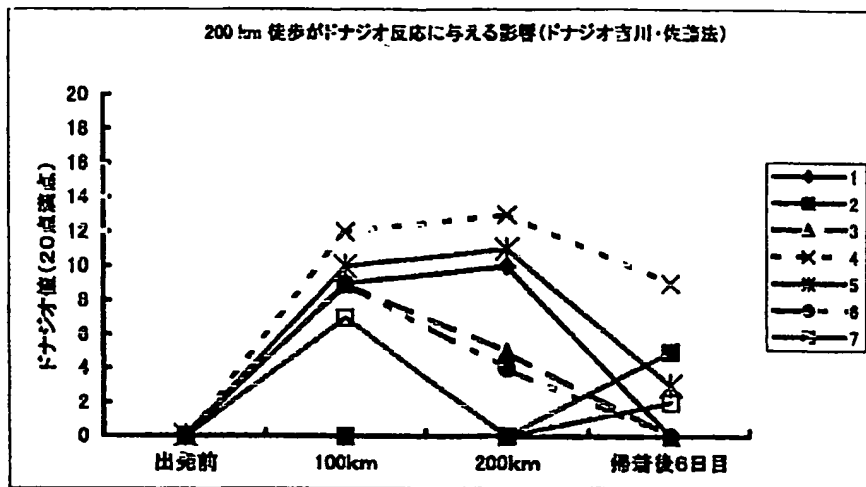
【図7】



【図10】

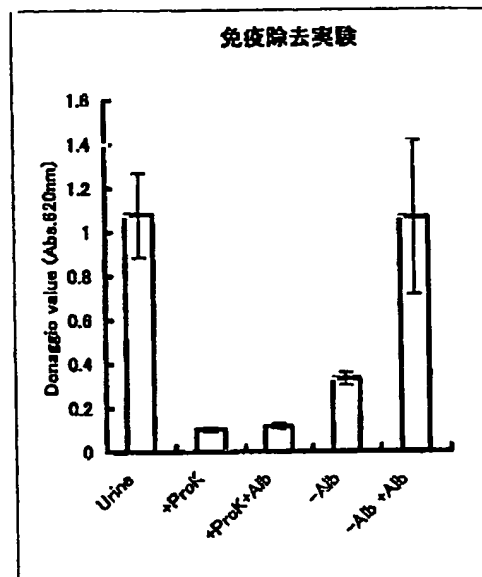
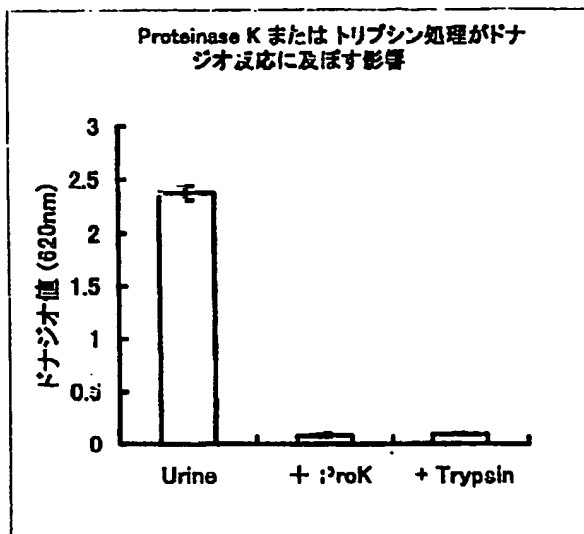


【図1B】



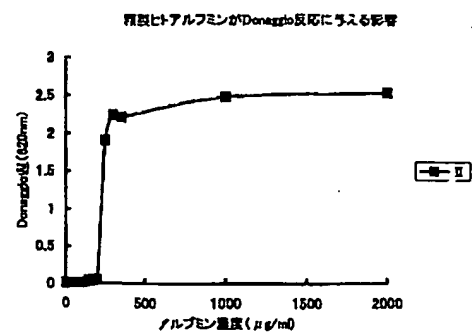
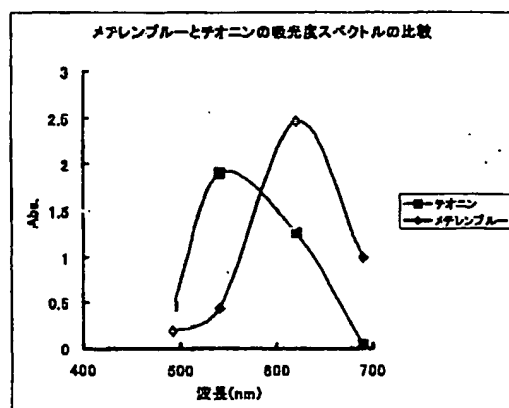
【図3】

【図4】

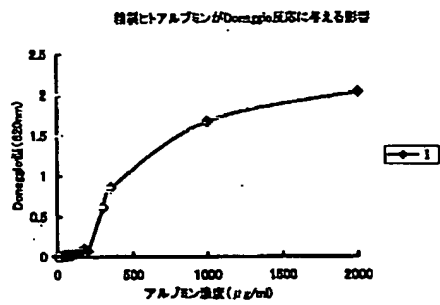


【図5】

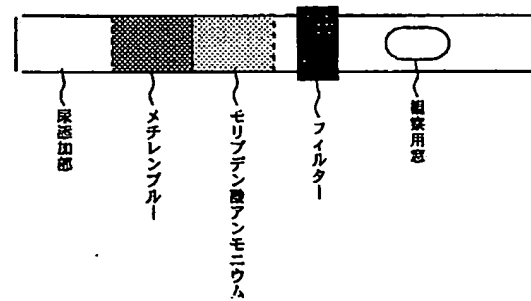
【図6】



【図8】



【図9】



フロントページの続き

(72)発明者 福岡 伸一  
京都府京都市伏見区醍醐中山町23-2-  
409

Fターム(参考) 2G045 AA16 BB05 DA38 FA29 FB01  
FB03 GC10  
2G054 AA07 CA23 CE01 EA04 GA03  
4H045 AA30 CA44 DA70 EA50